

Chapitre 7 : Dispositif microfluidique pour l'étude *in situ* par spectroscopie Raman exaltée par les plasmons de surface (SERS)

7.1 Introduction

La microfluidique est un outil très utile pour étudier différents processus biologiques comme la croissance des biofilms puisqu'elle permet un grand contrôle des paramètres de croissance, une diminution de la consommation de milieux de culture ou de réactifs et de protéger le milieu de croissance des conditions ambiantes. Les méthodes de fabrication des canaux microfluidiques rendent possibles une optimisation rapide de canaux complexes [121, 122]. On peut par exemple faire des mesures en parallèle [123] et intégrer plusieurs composantes fonctionnelles comme des électrodes, des valves et des éléments pour le contrôle de la température [96, 124, 125]. Tel que mentionné précédemment, la microfluidique appliquée à l'étude des biofilms est intéressante puisqu'on peut contrôler les forces de cisaillement sur les murs, la température et différents gradients. Les biofilms sont généralement caractérisés par microscopie conventionnelle, de fluorescence ou confocale [8, 10, 126].

Plusieurs méthodes pour faire de la spectroscopie Raman exaltée ont été utilisées dans la littérature. La technique la plus commune consiste à faire circuler des nanoparticules d'argent ou d'or dans le microcanal et à les mélanger avec la solution d'analyte [85-87, 127]. Il est possible d'augmenter l'intensité du signal en provoquant l'agrégation des nanoparticules de manière contrôlée en les faisant co-circuler avec une solution saline [84]. Les nanoparticules ont généralement tendance à adhérer sur les murs des microcanaux, augmentant ainsi de manière passive l'intensité du signal [128, 129]. Puisque les nanoparticules doivent circuler dans le microcanal,

une grande quantité de solution de nanoparticules doit être utilisée pour une expérience à long terme. Afin de contrer ces problèmes, plusieurs auteurs ont développé des méthodes pour préparer des surfaces actives en SERS au fond du microcanal. Cela confère une plus grande stabilité à la structure métallique et présente l'avantage d'être localisé au même endroit où l'on obtient le dépôt et la croissance des biomatériaux. La photoréduction de précurseurs d'argent et le recuit thermique rapide de films d'or minces permettent d'obtenir des surfaces nanostructurées d'argent [88, 89] et d'or [90] qui sont actives en SERS. Ces techniques nécessitent toutefois l'utilisation de laser pulsé femtoseconde et de laser UV. Cela est problématique pour plusieurs matériaux communément utilisés en microfluidique puisqu'ils peuvent induire des dommages photo induits ou reliés à la chaleur. L'autre approche utilisée dans la littérature est la déposition de métal sur un substrat nanostructuré directement dans un microcanal [91-94]. Cette méthode nécessite toutefois plusieurs étapes de photolithographie qui sont complexes avant la déposition de métal.

Dans ce chapitre, une méthode simple pour la fabrication d'un substrat SERS pour l'imagerie spectrale *in situ* dans un dispositif microfluidique sera présentée. Elle permet d'obtenir un rehaussement du signal Raman et donne la possibilité de déposer une couche métallique sur toute la surface du microcanal sans obstruer le parcours optique. Un dispositif à deux étages a aussi été conçu afin de faire co-circuler la solution d'analyte avec une solution de confinement. Cela nous a permis de confiner la solution d'analyte au fond du microcanal où se situe le substrat SERS. Ces fonctionnalités seront démontrées en faisant une image spectrale unidimensionnelle de la concentration locale d'un précurseur de biofilm dans un microcanal. Ces résultats seront comparés à des micrographies de deux flux de solution colorées dans les mêmes conditions.

7.2 Profil d'écoulement dans le dispositif microfluidique

Avant de procéder aux mesures SERS, il est utile de déterminer le profil d'écoulement dans le dispositif microfluidique à deux étages qui est présenté à la section expérimentale. La microscopie en champ clair a été utilisée pour ces mesures. Un dispositif sans la couche métallique est utilisé puisqu'il est nécessaire que l'échantillon soit transparent. Une solution colorée en bleu représente l'analyte et est insérée dans l'entrée 1 afin d'être confinée au centre du microcanal. Une solution colorée en rouge représente la solution de confinement et est insérée dans l'entrée 2. La Figure 7-1 A montre une micrographie de ce dispositif prise près de la jonction où l'analyte est ajouté. Les valeurs de pixel pour les canaux rouge et bleu de la caméra couleur ont été extraites dans la section transversale du microcanal (voir Figure 7-1 B). Elles ont ensuite été normalisées afin que les valeurs les plus faibles pour les deux canaux soient à zéro et que leurs maxima aient la même intensité. Les profils des deux écoulements montrent des tendances opposées. Le profil de l'analyte est maximal au centre du canal alors que celui de la solution de confinement est maximal sur les côtés. La transition entre les deux se fait graduellement. Dans des conditions de flux laminaire, le mélange entre deux solutions se fait seulement par diffusion. Puisque la mesure est faite directement à la jonction, on peut considérer que le profil observé n'est pas dû à la diffusion. L'absorbance pour un composé est reliée à son absorptivité, à sa concentration et au parcours optique. Comme les deux premiers facteurs restent constants, il faut que le parcours optique varie. Bien que cela ne permet pas de définir précisément sa forme, cela suggère que la base est plus large que le haut que qu'il y a un étranglement graduel de l'écoulement de l'analyte (en bleu) en s'éloignant du fond du microcanal.

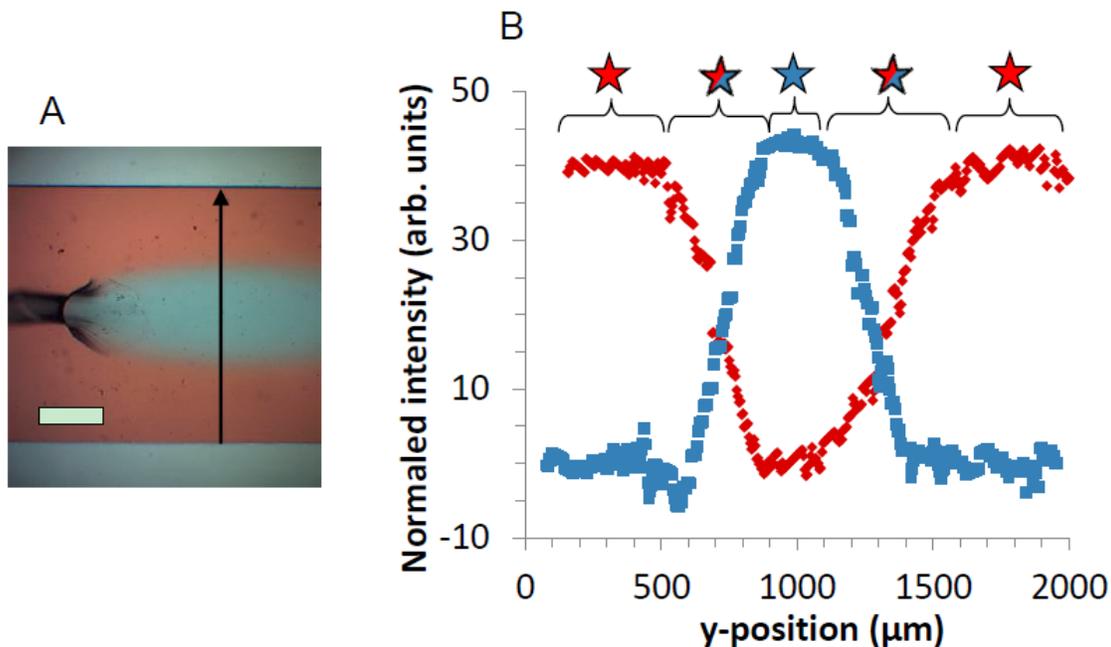


Figure 7-1 A) Micrographie en champ clair avec une caméra couleur pour un écoulement avec des liquides colorés avec des débits de 0,34 mL/h et 0,14 mL/h (en rouge et en bleu, respectivement). B) Valeurs de pixel normalisées pour les canaux bleu et rouge de la caméra couleur dans la section transversale du microcanal représentée par la ligne noire en A). Une étoile bleue montre les régions correspondant au liquide de confinement et une étoile rouge pour l'analyte. Les parties où les deux sont observés sont identifiés par une étoile avec les deux couleurs. La barre d'échelle dans A) mesure 500 µm.

7.3 Caractérisation des surfaces d'argent

Les surfaces préparées directement après déposition de l'argent présentent une faible augmentation du signal Raman attribuable à la surface légèrement rugueuse produite par la réaction de Tollens. L'exposition au plasma d'air permet d'améliorer l'effet SERS des surfaces d'argent. Ce traitement est connu pour nanostructurer davantage les surfaces et nettoyer les composés organiques résiduels présents après la déposition. Ces effets sont causés par la pulvérisation des atomes ionisés du plasma et par oxydation [107, 130, 131]. Les effets du traitement par plasma ont été caractérisés par spectroscopie UV-Vis en réflectance, par microscopie à force

atomique (AFM) et par spectroscopie Raman. La Figure 7-2 montre les images AFM de la surface d'argent après déposition et suivant le traitement par plasma d'air. Les deux surfaces possèdent des structures larges de forme plutôt arrondie. La principale différence observée pour celle après le traitement est que ces structures deviennent plus irrégulières. Cela a généralement pour effet d'augmenter l'effet Raman pour une surface [81].

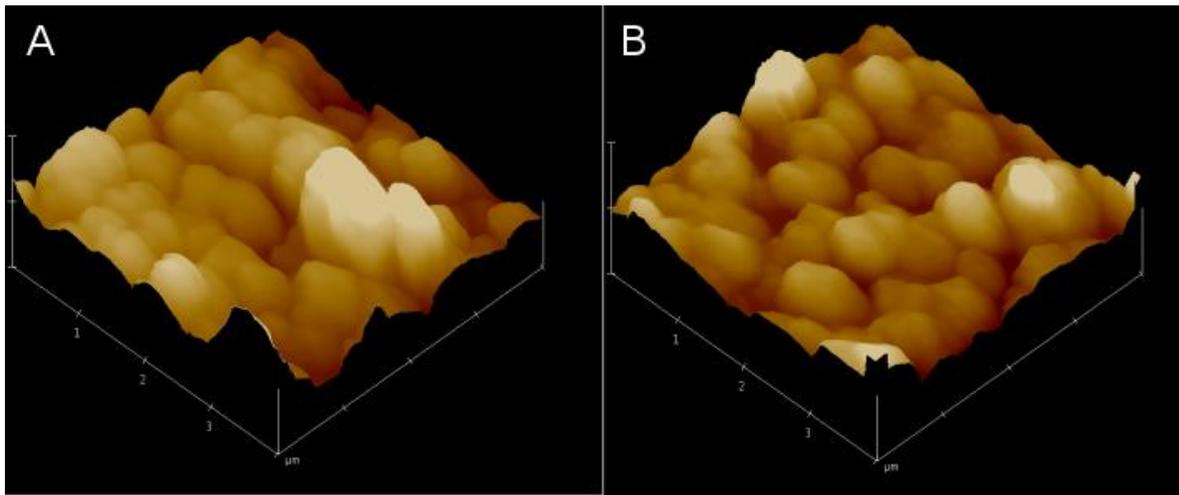


Figure 7-2 : Image AFM en mode de percussion de la surface nanostructurée d'argent avant (A) et après 20 minutes de traitement par un plasma d'air (B). L'échelle dans les plans X et Y est de 1 μm /division. Les images ont été acquises sur une aire de 100 μm^2 à une fréquence de balayage de 0,25 Hz.

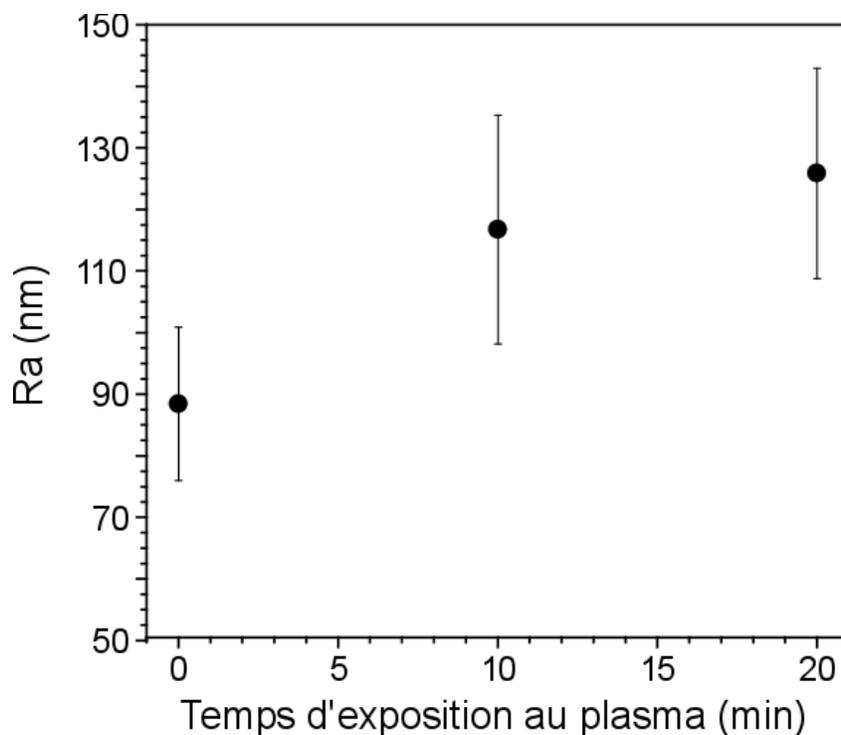


Figure 7-3 : Facteur de rugosité (R_a) des surfaces d'argent déterminé à partir des images AFM pour différents temps d'exposition à un plasma d'air.

Tel qu'observé à la Figure 7-3, les analyses de rugosité faites à partir des images AFM indiquent qu'elle augmente d'environ 40% dans les premières 20 minutes d'exposition. Ces résultats correspondent bien à ce qui a été observé précédemment dans la littérature [132, 133]. Les bandes d'absorption plasmonique dans le domaine UV-Visible en réflectance diffuse ont été caractérisées. On peut voir à la Figure 7-4 A qu'elles augmentent en intensité et qu'elles deviennent plus larges lors du traitement par plasma d'air. On observe aussi que le centre des bandes reste à la même longueur d'onde. La Figure 7-4 B montre l'intensité en Raman pour la bande $\nu\text{C-COO}^-$ du citrate de sodium sur surfaces d'argent pour différents temps d'exposition à un plasma d'air. Après 20 minutes d'exposition, le signal Raman est fortement augmenté. La longueur d'onde de la source d'excitation laser est 514,5 nm. Tel qu'observé dans les spectres UV-Vis à la Figure 7-4 A, l'absorbance est plus élevée. Cela indique qu'il y a une plus grande absorption des plasmons de surface, ce qui explique pourquoi on obtient un effet SERS. Afin de mieux suivre

l'effet du traitement plasma sur la surface d'argent nanostructurée, une déconvolution spectrale des spectres UV-Vis en réflectance diffuse a été faite afin de mieux suivre l'effet du traitement plasma sur la surface d'argent. La Figure 7-5 A montre le spectre d'une surface après dix minutes de traitement plasma. Trois bandes ont été utilisées pour cette déconvolution et elles sont centrées à 397, 439 et 466 nm. La Figure 7-5 B montre l'intensité de ces trois bandes qui a été déterminée par déconvolution. L'intensité pour les trois bandes augmente toutes jusqu'à 16 minutes de traitement plasma puis reste stable. L'effet est plus prononcé pour la bande à 397 nm que pour les autres.

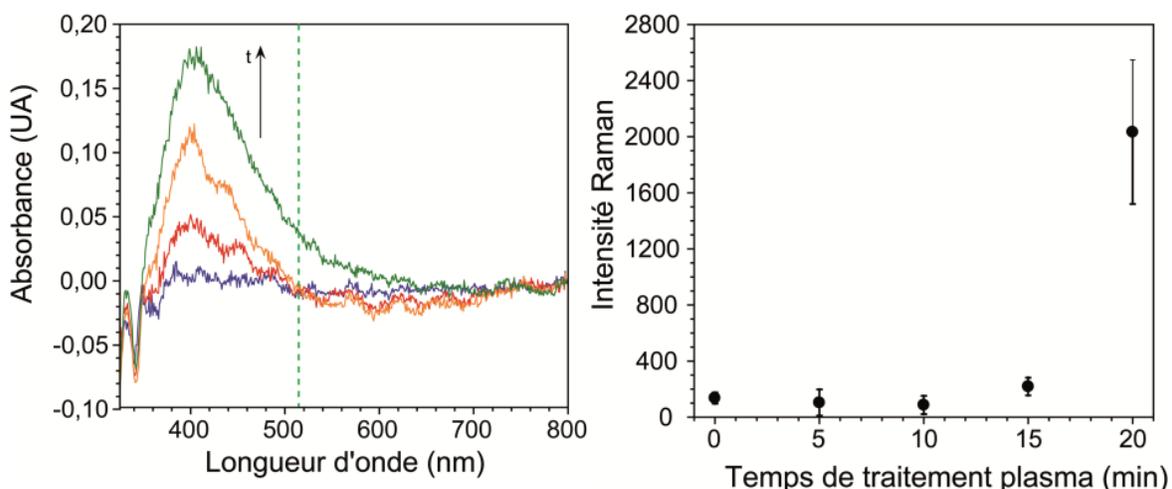


Figure 7-4 : A) Spectres UV-vis en réflectance diffuse de la surface nanostructurée d'argent après 1, 5, 10 et 19 minutes (courbes bleue, rouge, orange et verte, respectivement) de traitement plasma. Pour chaque spectre, le spectre de la surface d'argent après déposition a été utilisé comme référence. La ligne brisée verte correspond à la longueur d'onde du laser utilisé pour les mesures Raman. B) Intensité Raman pour la bande $\nu\text{C-COO}^-$ du citrate à 952 cm^{-1} à différents temps d'exposition au plasma avec la source d'excitation à $514,5\text{ nm}$. Les barres d'erreur ont été générées pour des mesures séparées à différents endroits sur le même substrat.

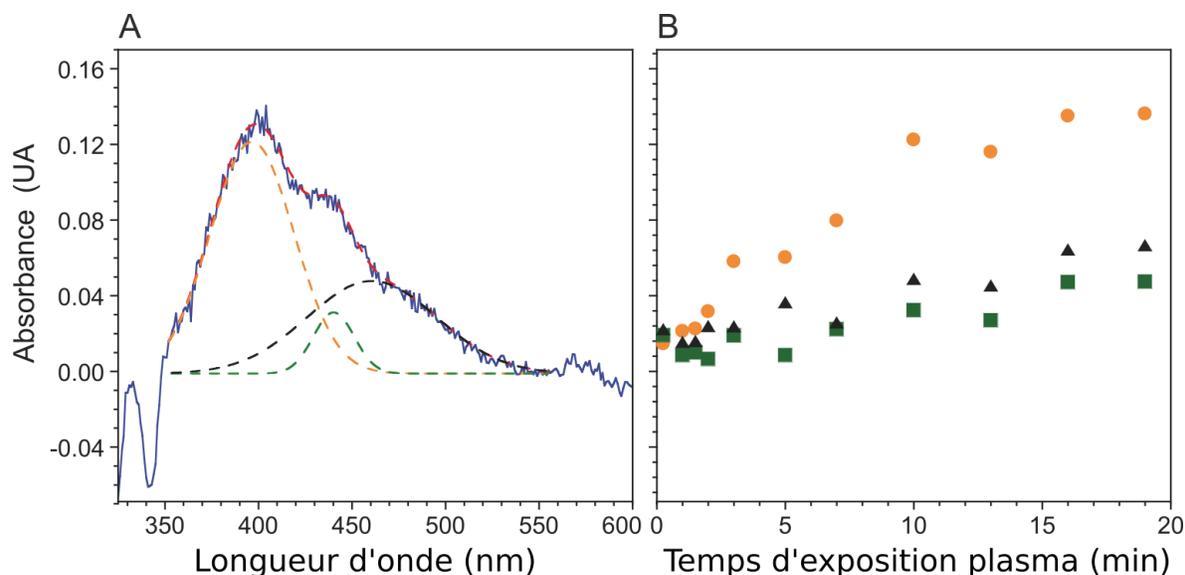


Figure 7-5 : A) Déconvolution spectrale d'un spectre UV-visible en réflectance diffuse (ligne continue bleue) de la surface d'argent nanostructurée après exposition à un plasma d'air (600 mTorr, 29,6 W). Les trois bandes utilisées pour la déconvolution spectrale sont centrées à 397, 439 et 466 nm (lignes discontinues en orange, vert et noir, respectivement). B) Intensité des bandes à 397, 439 et 466 nm (points orange, carrés verts et triangles noirs, respectivement) obtenues par déconvolution des spectres à différents temps d'exposition au plasma.

7.3.1 Calibration de la surface active SERS

L'efficacité des surfaces d'argent préparées pour le SERS dans des microcanaux a été testée premièrement en déterminant la limite de détection à partir d'une courbe de calibration, deuxièmement en vérifiant que le signal obtenu est indépendant du débit et finalement en s'assurant qu'on ait une réponse rapide après un changement de concentration de l'analyte.

L'intensité du signal Raman exalté pour différentes concentrations connues d'un analyte est d'abord utilisée afin d'obtenir une courbe de calibration. Cela nous permettra de déterminer la concentration d'analyte dans un échantillon. Cela est particulièrement important pour les surface actives SERS dans un microcanal puisque l'augmentation plasmonique est sensible à la méthode de fabrication et peut varier entre les échantillons. La bande $\nu\text{-COO}^-$ à 952 cm^{-1} (Figure 7-6 A) du citrate

de sodium est utilisée pour la courbe de calibration. Cette bande est préférable à la bande νCH_2 puisqu'elle est plus intense et elle ne chevauche pas la bande $\nu\text{O-H}$ de l'eau qui est utilisée pour la normalisation du signal. La Figure 7-6 B montre l'intensité normalisée de la bande à 952 cm^{-1} . Les spectres ont été acquis en utilisant la surface active SERS préparée tel qu'il est indiqué dans la section expérimentale avec un temps d'acquisition de 60 secondes et une intensité du laser de 10 mW. Un débit de 0 mL/h a été utilisé afin d'éliminer un refroidissement de la surface causé par l'écoulement afin de démontrer l'utilité d'une faible puissance laser et d'éviter la production de bulles induites par la chaleur. Pour des mesures avec une puissance de 100 mW, des bulles étaient formées sur la surface SERS, sauf lorsque des débits élevés étaient utilisés. La diminution de l'énergie amenée au système par le laser a aussi d'autres avantages notables. On évite la photodégradation de l'analyte ainsi que les distorsions dans l'écoulement par convection produit par chauffage local sur la surface. La Figure 7-6 B montre la courbe de calibration linéaire pour la bande à 952 cm^{-1} du citrate de sodium entre 0,1 et 5 mM. Les concentrations plus faibles n'ont pas été mesurées puisque cet intervalle est suffisant pour les présents travaux. De plus, une non-linéarité du signal en fonction de la concentration peut se produire en dehors de cet intervalle [90, 134]. À des concentrations plus faibles que 0,1 mM, la pente est plus grande. C'est pour cette raison que la droite ne passe pas par zéro. À titre de comparaison, sans le substrat SERS, la limite de détection était de 10 mM avec un temps d'acquisition de 600 secondes et une puissance de laser de 250 mW. Une plus grande sensibilité en dessous du millimolaire devrait permettre des études futures en cinétique pour la dégradation du citrate catalysée par les biofilms. De plus, la diminution du temps d'acquisition permet de prendre davantage de spectres dans un laps de temps donné, ce qui est un avantage pour l'imagerie spectrale.

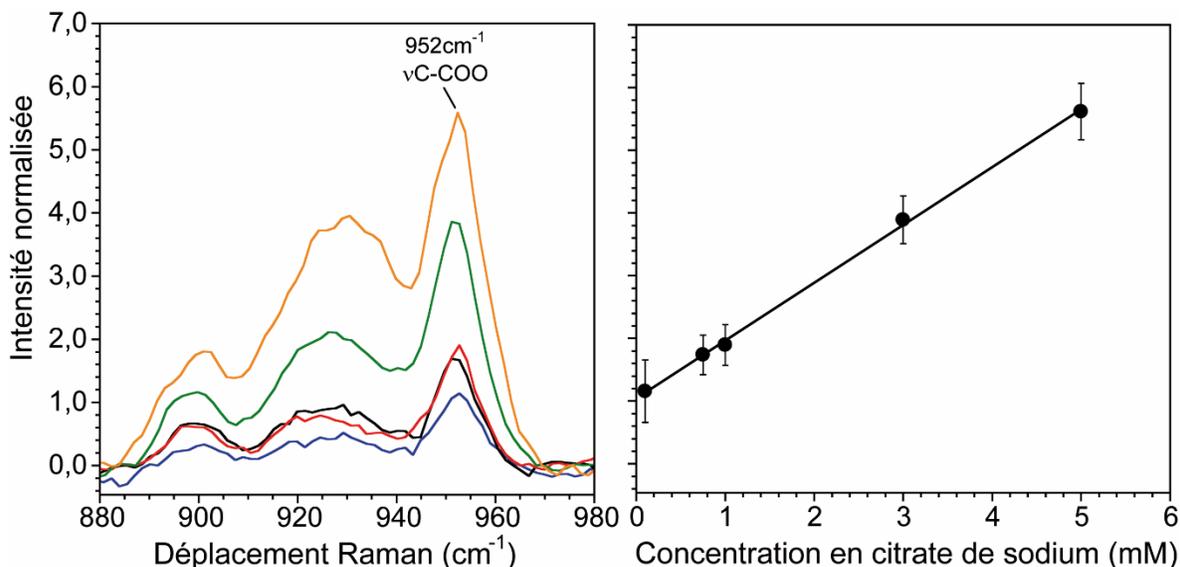


Figure 7-6 : A) Spectres Raman du citrate de sodium sur la surface active SERS dans la région $\nu\text{C-COO}^-$ à des concentrations entre 0,1 et 5 mM. Les acquisitions ont été faites avec un laser vert à 514,5 nm à une puissance de 10 mW et un temps d'acquisition de 60 s. Les spectres ont été normalisés à partir de la bande $\nu\text{O-H}$ de l'eau à 3535 cm^{-1} . Chaque spectre correspond à la moyenne de cinq spectres à la même concentration. B) Courbe de calibration pour le citrate de sodium à partir de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ à 952 cm^{-1} . L'écart type pour quatre mesures à chaque concentration a été utilisée pour les barres d'erreur.

Des mesures ont ensuite été faites afin de s'assurer que l'écoulement n'a pas d'effet sur les mesures. Pour ces expériences, une solution 5 mM de citrate de sodium a été introduite dans le microcanal à des débits entre 0 mL/h et 3 mL/h. Pour chaque débit, plusieurs spectres ont été acquis avec une puissance du laser de 10 mW et un temps d'acquisition de 60 s. En comparant leurs moyennes, il a été conclu qu'il n'y a pas de différence significative pour l'intensité moyenne, donc que le débit de la solution n'a pas d'effet sur l'intensité du signal observé par SERS.

La réponse suivant un changement rapide de la concentration a ensuite été déterminée en faisant circuler une solution de citrate de sodium 5 mM à un débit de $Q_2 = 0,5\text{ mL/h}$ à 0 mL/h tout en augmentant le débit d'eau de $Q_1 = 0\text{ mL/h}$ à $0,5\text{ mL/h}$. Tel qu'on peut observer à la Figure 7-7, le changement de l'intensité dans le temps indique une diminution rapide de l'intensité à la suite du changement de

concentration. La diminution lente au début peut être attribuée à l'écoulement résiduel dans le système à la suite du changement des débits des pompes à seringue. Pour les expériences subséquentes, il faut donc attendre au minimum trois minutes suivant un changement de concentration de l'analyte afin que le système soit bien stable. Ce délai pourrait être réduit en utilisant des tubes plus courts pour relier les seringues au dispositif microfluidique. Le remplacement des seringues en plastique par des seringues en verre pourrait aussi réduire le délai puisque ces dernières ont moins de friction entre le piston et le corps. Cela est dû au joint du piston en caoutchouc des seringues en plastique.

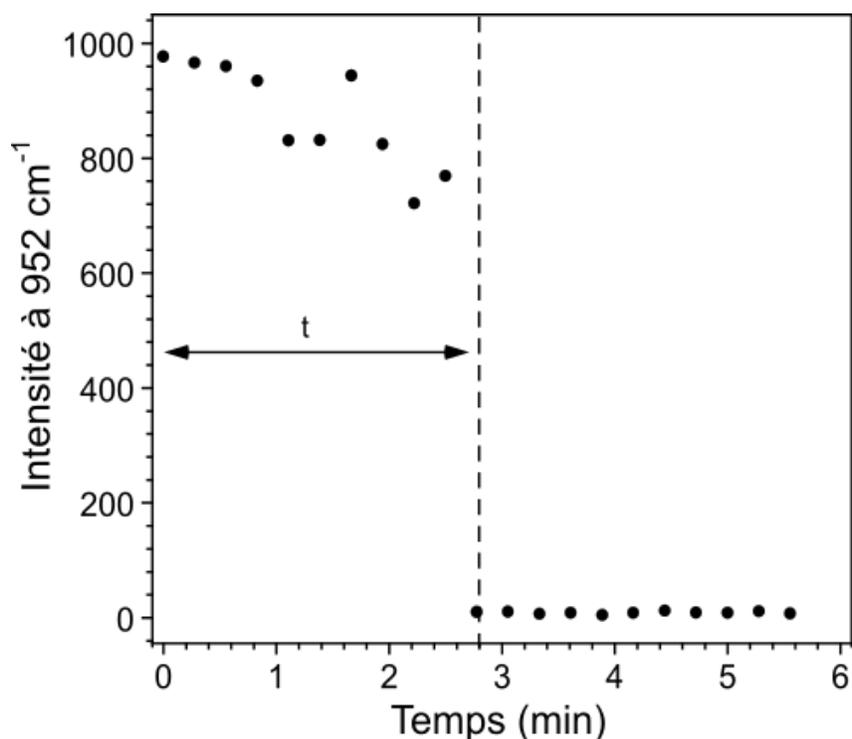


Figure 7-7 : Changement d'intensité de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ en Raman pour une solution 5 mM de citrate de sodium après avoir été remplacée par de l'eau. Initialement, la solution de citrate de sodium circulait par l'entrée 2 à 0,5 mL/h. Le débit à l'entrée 2 a été diminué à 0 mL/h tout en augmentant le débit d'eau dans l'entrée 1 à 0,5 mL/h. Les spectres ont été acquis en continu chaque 15 s avec un laser à 514,5 nm à une puissance de 10 mW. Le temps t , correspondant à près de trois minutes sur la figure indique le temps nécessaire pour que le système réponde.

7.4 Imagerie spectrale du citrate de sodium dans le microcanal

La concentration et la répartition de l'écoulement d'une solution de citrate de sodium 5 mM ont été observés par SERS en mode d'imagerie dans la section transversale du microcanal. Afin de valider les résultats, la microscopie optique a été utilisée pour observer un écoulement de solutions colorées dans les mêmes conditions. La Figure 7-8 A montre une micrographie d'une solution de citrate de sodium à un débit $Q_2 = 0,15$ mL/h circulant sur la surface active SERS et émergeant de la jonction entre les deux niveaux du dispositif microfluidique. Le débit de la solution de confinement est de $Q_1 = 0,34$ mL/h. Afin de montrer la possibilité d'utiliser cette plateforme pour confiner la croissance d'un biofilm, un dispositif microfluidique a été inoculé avec des bactéries *Pseudomonas sp*, et cultivées avec milieu de culture AB confiné dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la Figure 7-8 A. La Figure 7-8 B montre la micrographie d'un biofilm confiné par l'écoulement 48h après l'inoculation.

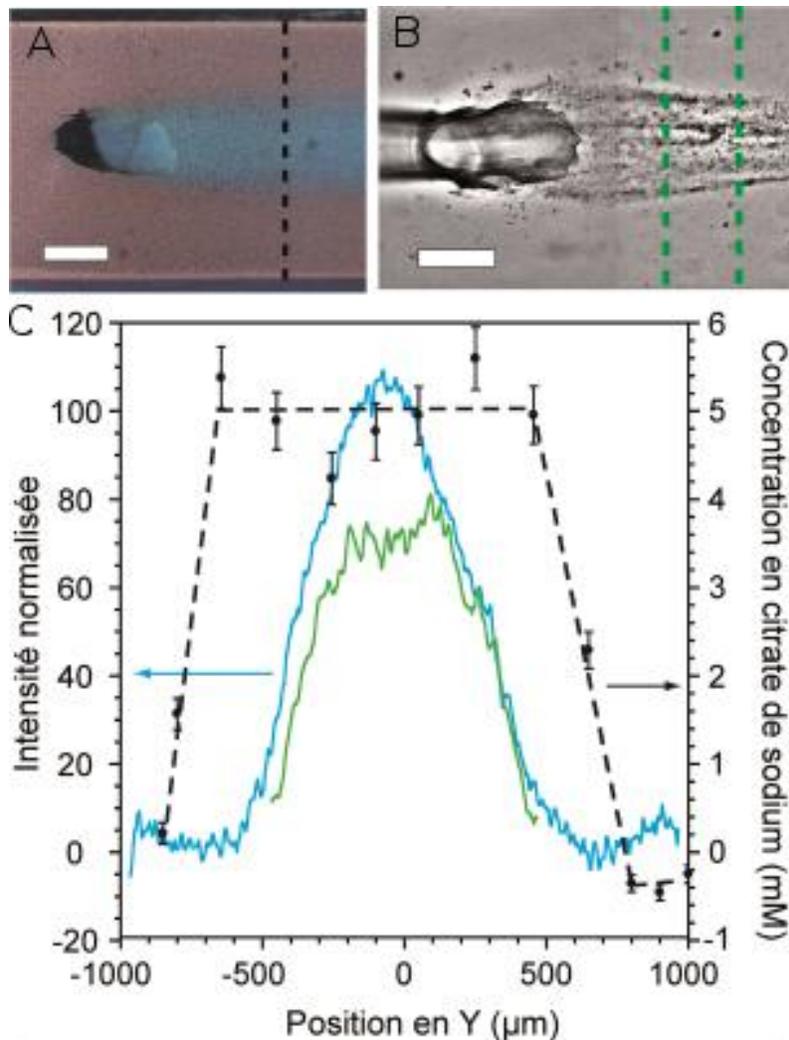


Figure 7-8 : A) Micrographie du microcanal à la jonction entre les solutions d'eau (rouge) et citrate de sodium 5 mM (bleu) avec des débits de 0,34 et 0,15 mL/h, respectivement. B) Micrographie du biofilm de *Pseudomonas sp* CT07 confiné par l'écoulement après 48 h de croissance à 22 °C. C) Mesures de densité optique et SERS dans la section transversale de la solution de citrate de sodium et d'un biofilm confiné. Le profil de concentration du citrate de sodium (points noirs) a été mesurée sur la ligne noire indiquée en A). La concentration en citrate de sodium a été mesurée à partir de l'intensité normalisée de la bande $\nu\text{C-COO}^-$ (952 cm^{-1}) et de la courbe de calibration déterminée précédemment (Figure 7-7 B). Les barres d'erreur proviennent de l'incertitude de la régression linéaire de la courbe de calibration. La ligne pointillée noire est utilisée en tant que repère visuel. Le profil par microscopie optique de la solution confinée dans la section transversale a été mesuré en déterminant les valeurs de pixel du canal bleu de la caméra qui correspondent à la solution bleue à différentes positions dans le microcanal et en calculant la moyenne (ligne bleue). La densité optique dans la section transversale du biofilm confiné (ligne verte) a été mesurée à partir de micrographies acquises entre 48 et 56 heures après l'inoculation. Les barres d'échelles mesurent 500 μm.

Le profil de la solution de citrate de sodium et du biofilm confiné dans la section transversale des Figure 7-8 A et B a été mesuré quantitativement par microscopie optique et en SERS. Ces résultats se retrouvent à la Figure 7-8 C. Pour les mesures SERS, aucun colorant n'a été utilisé afin d'éviter la fluorescence et la présence de bandes vibrationnelles supplémentaires. À proximité des murs du microcanal, les concentrations mesurées étaient de zéro, ce qui indique la présence de la solution d'eau utilisé pour le confinement. Un peu plus loin des murs, la concentration augmente rapidement jusqu'à ce qu'elle forme un plateau à 5 mM tel qu'attendu. La largeur de ce plateau est d'environ 1100 μm . L'efficacité de l'effet SERS diminue rapidement pour les distances plus grandes que 3 nm à partir de la surface. Par conséquent, le plateau représente la largeur de l'écoulement de citrate de sodium au fond du canal. Afin de valider les résultats obtenus, des mesures de densité optique ont été faites à partir de micrographies en microscopie optique dans la même région que les mesures SERS. Le profil dans la section transversale de ces mesures forme une courbe en forme de cloche (Figure 7-8 C). La différence entre les formes des courbes obtenues à partir des deux méthodes provient principalement du fait que les mesures par microscopie optique proviennent la densité optique dans tout le parcours optique alors que les mesures SERS représentent la concentration sur la surface. Le flux de citrate de sodium est plus large à la base puisqu'il émerge à partir du fond du canal. Par conséquent, l'endroit où la densité optique commence à augmenter correspond à la jonction entre les deux solutions. La largeur à la base pour la courbe de densité optique est de 1150 μm , ce qui correspond bien aux mesures SERS.

La densité optique du biofilm confiné est représentée à la Figure 7-8 C. La croissance du biofilm est confinée au centre du canal, là où la concentration en citrate de sodium est non-nulle. De plus, le profil de densité optique du biofilm correspond à celui de la solution colorée représentant le citrate de sodium. Cela indique que la hauteur de la solution de nutriment confinée a un impact sur la croissance du biofilm. Cette approche pourrait être utilisée dans le futur afin d'obtenir

davantage d'informations pour les études en microfluidique de la croissance des biofilms.

La concentration en citrate de sodium mesurée en SERS indique qu'il y a un gradient de concentration entre les solutions contenant 5 mM et 0 mM de citrate de sodium. Cela provient de la diffusion des molécules de citrate de sodium près de la surface active en SERS entre les deux solutions. Des expériences futures sont prévues afin de corrélérer ces gradients de concentration à la diffusion du citrate de sodium sur la surface active SERS.

7.5 Conclusion

Un dispositif microfluidique avec une surface plasmonique active en SERS a été démontrée comme étant efficace pour l'imagerie spectrale et optique d'un biofilm et de son milieu de culture. La surface active SERS a été formée en utilisant des équipements facilement disponibles pour différents groupes de recherche. Cette technique est applicable pour des canaux de géométrie complexe et n'est pas limitée à certains matériaux particuliers. L'augmentation de la sensibilité grâce au SERS permet de mesurer des concentrations en dessous du millimolaire, de faire des acquisitions rapides et de travailler avec une puissance de laser faible. L'architecture du canal à deux niveaux permet d'avoir un confinement de la solution de citrate de sodium sur la surface plasmonique, permettant ainsi l'imagerie optique et SERS. Les résultats de profil d'écoulement en microscopie optique et en SERS sont complémentaires. Il a aussi été possible de confiner la croissance d'un biofilm dans le microcanal. Différentes optimisations doivent être explorées comme les conditions pour le traitement plasmonique de la surface active SERS et l'utilisation d'un laser avec une longueur d'onde plus près du maximum d'absorption plasmonique de la surface métallique. Le dispositif microfluidique et la méthodologie développée permettront de faire de l'imagerie spectrale de biofilms et de leur environnement chimique dans différentes conditions hydrodynamiques.